

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
26 de Julio de 2001 (26.07.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 01/53010 A1**

(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: **B08B 3/04**,  
17/02, C11D 3/386

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES00/00360

(22) Fecha de presentación internacional:  
25 de Septiembre de 2000 (25.09.2000)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P 200000113 20 de Enero de 2000 (20.01.2000) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo  
US): **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
RECTORADO** [ES/ES]; Avenida de Séneca, 2, E-28040  
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): SAN

**JOSE SERRAN, Carmen** [ES/ES]; Facultad de veterinaria, Dpto. nutrición y bromatología III, E-28040 Madrid (ES). **JASPE RODRIGUEZ, Almudena** [ES/ES]; Facultad de veterinaria, Dpto. nutrición y bromatología III, E-28040 Madrid (ES). **RUIZ PEREZ, Begonia** [ES/ES]; Facultad de veterinaria, Dpto. nutrición y bromatología III, E-28040 Madrid (ES). **MAIRA LITRAN, Tomas** [ES/ES]; Facultad de veterinaria, Dpto. nutrición y bromatología III, E-28040 Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AU, CA, JP, US.

(84) Estados designados (regional): patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: ENZYMATIC PROCESS FOR FLUIDIZING OR DETACHING BIOFILMS FROM DIFFERENT INTERFACES

(54) Título: PROCEDIMIENTO ENZIMATICO PARA FLUIDIFICAR O DESPRENDER BIOFILMS DE DISTINTAS INTERFASES

(57) Abstract: The invention concerns an enzymatic process for detaching or facilitating removal of biofilm that has accumulated during solid-liquid-air interfaces and solid-liquid interfaces of aqueous systems. This is achieved by exposing the biofilm to a cleaning preparation containing at least one enzyme pertaining to the carbohydrase and protease group. Sequential treatment of the biofilm initially using a cleaning preparation essentially containing carbohydrase and then using a cleaning preparation essentially containing protease makes it possible to eliminate up to 85 % of accumulated biomass and up to 100 % of adhered cells.

(57) Resumen: Se trata de un procedimiento enzimático para desprender y facilitar la eliminación de biofilm acumulado en las interfases sólido-líquido-aire y sólido-líquido de sistemas acuosos. Esto se consigue mediante la exposición del biofilm a un preparado de limpieza que incluye al menos una enzima perteneciente al grupo de las carbohidrasas y proteasas. El tratamiento secuencial del biofilm, primero con un preparado de limpieza que consiste esencialmente en carbohidrasas y después con una que incluye esencialmente proteasas, permite eliminar hasta el 85 % de la biomasa acumulada y hasta el 100 % de las células adheridas.

WO 01/53010 A1

TÍTULO: Procedimiento enzimático para fluidificar o desprender biofilms de distintas interfases

## OBJETO DE LA INVENCION:

5

La presente invención se encuadra dentro del campo técnico de limpieza y desinfección de superficies. De forma más concreta, la invención se refiere a un procedimiento para eliminar biofilms, también denominados biopelículas, películas biológicas, biocapas o películas microbianas, formados por distintos microorganismos en las interfases sólido-líquido-aire y sólido-líquido de sistemas acuosos (sistemas que contienen agua, sistemas fluidos); y a la utilización de al menos una enzima, perteneciente al grupo de las carbohidrasas o proteasas, en este procedimiento.

15

## ANTECEDENTES

20

La adhesión de microorganismos a superficies es un hecho frecuente en los sistemas acuosos. El crecimiento de los microorganismos asociados a superficies u otras interfases conlleva la formación de biofilms, esto es, un consorcio de células embebidas en una matriz exopolimérica.

25

30

La presencia de biofilms en distintos procesos industriales se relaciona con problemas higiénicos y tecnológicos. Dentro de los primeros, destaca su papel como reservorio de microorganismos patógenos y alterantes, contaminantes de instalaciones de la industria alimentaria y biotecnológica. Por otra parte, la formación de biopelículas se asocia con el deterioro de materiales, como la corrosión de sustratos metálicos y el recubrimiento de otros sustratos, provocando incrementos en el gasto energético, como en los intercambiadores de calor y los sistemas de distribución de fluidos, disminución de la eficacia de los procesos, como en el tratamiento de aguas o la fabricación de papel, e incluso la inutilización de las conducciones. El desarrollo de biofilms puede también tener

lugar en superficies de interés clínico, como las lentes de contacto o los implantes, y constituyendo la base de la formación de placa dental.

La población microbiana presente en el biofilm depende de los microorganismos adheridos inicialmente, de su proliferación en el biofilm y de su desprendimiento y paso a la fase líquida. Entre los microorganismos encontrados en biofilms son particularmente frecuentes las bacterias Gram negativas, sobre todo, especies de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Desulfovibrio*, *Escherichia* y *Enterobacter*, y en menor proporción bacterias Gram positivas, mohos, levaduras y algas. Gran parte de estos microorganismos son aerobios estrictos, por lo que su crecimiento en la interfase sólido-líquido-aire, suele ser mayor que en la sólido-líquido (zona sumergida), donde la disponibilidad de oxígeno es menor.

La matriz exopolimérica o glicocalix, en la que las células adheridas se encuentran atrapadas, es la responsable de la estructura y organización del biofilm, y está constituida principalmente por polisacáridos y proteínas. Su producción y composición, además de relacionarse con el tipo de microorganismo y superficie (Ruiz y col., 1999 en *Biofilms: The Good, the Bad and the Ugly*. Editado por J. Wimpenny, P. Gilbert, J. Walker, M. Brading y R. Bayston. Bioline), dependen de las condiciones nutritivas y ambientales (Sutherland, 1997 en *Biofilms: Community Interactions and Control*. Editado por J. Wimpenny, P. Handley, P. Gilbert, H. Lappin-Scott y M. Jones. Bioline). El oxígeno es uno de los factores limitantes del crecimiento de los principales microorganismos implicados en la formación de biofilms; la acumulación de células y material exopolimérico puede llegar a ser mayor en la interfase sólido-líquido-aire que en la sólido-líquido.

La eliminación de biofilms industriales suele realizarse mediante procedimientos de limpieza mecánicos combinados con el uso de biocidas. Los microorganismos acumulados en el biofilm se caracterizan por presentar una elevada resistencia a los agentes de desinfección habitualmente empleados en los

procesos industriales. Parte de este efecto se atribuye al glicocalix, que constituye una barrera a la penetración de los compuestos presentes en la fase líquida. Aunque se elimine la mayor parte de las células viables del biofilm, el material exopolimérico residual puede sustentar el crecimiento de nuevos microorganismos. Por ello, una eliminación eficaz de la matriz permitirá el desprendimiento del biofilm limitando además los problemas asociados a la recolonización microbiana. La degradación enzimática del glicocalix, tiene por otra parte la ventaja de ser un procedimiento de limpieza, respetuoso con el medio ambiente y con la integridad de las superficies.

10

En la bibliografía científica se han descrito una amplia variedad de métodos para prevenir y eliminar biofilms formados en sistemas acuosos industriales, mediante la utilización de una o más enzimas que degradan la matriz exopolimérica, solas o combinadas con otros compuestos como biocidas, agentes surfactantes o quelantes (WO 9617632, WO 9826807, EP 0590746, WO 9631610, WO 9213807, US 5071765, WO 9914312). Estos métodos han sido desarrollados fundamentalmente para prevenir y eliminar biofilms sumergidos. Su eficacia puede ser significativamente menor cuando se aplican a biofilms formados en la interfase sólido-líquido-aire que son bastante más gruesos, particularmente en los cultivos en continuo prolongados y en los discontinuos, al final de la fase exponencial.

20

### EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

25

En líneas generales y para conseguir los objetivos preconizados, a la vez que eliminar los problemas citados en el apartado anterior, el objeto de esta invención es el desarrollo de un procedimiento respetuoso con el medio ambiente y las superficies de los sistemas acuosos, eficaz para desprender total o parcialmente biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-líquido.

30

Otro objeto de esta invención es el desarrollo de un procedimiento capaz de modificar las propiedades reológicas de la matriz exopolimérica del biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-líquido de los sistemas acuosos, de forma que facilite la eliminación posterior del biofilm mediante la aplicación de otros procedimientos físicos o químicos de limpieza y desinfección.

Esta invención tiene también por objeto definir la composición de un producto de limpieza que consiste esencialmente en carbohidrasas y proteasas, para eliminar biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire, como en la sólido-líquido de sistemas acuosos, compatible con la utilización independiente o combinada de otros agentes de limpieza como inhibidores de la corrosión, surfactantes, biocidas, entre otros.

Exactamente, el procedimiento enzimático para fluidificar o desprender biofilms de distintas interfases, objeto de la invención, consiste en un sistema para prevenir, desprender y facilitar la eliminación de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire (en esta invención denominado biofilm en interfase) como en la sólido-líquido (en esta invención denominado biofilm sumergido) de sistemas acuosos, mediante la exposición a un preparado de limpieza que incluye al menos un enzima del tipo de carbohidrasas o proteasas, en una cantidad suficiente para que la matriz exopolimérica se degrade y permita el desprendimiento total o parcial del biofilm y se modifiquen sus propiedades reológicas, facilitando la posterior eliminación del biofilm mediante otros procedimientos de limpieza y desinfección.

Entre las carbohidrasas que resultan útiles para esta invención, pero no constituyen un límite, se incluyen los siguientes productos de Novo Nordisk AS; Citrozym Low GA, Citrozym Cloudy L, Citrozym Cloudy 100L, Citrozym LS, Citrozym Ultra L, Citrozym Ceo, Pectinex Ultra SP-L, Pectinex Smash, Bio-Cip Membrane, Cellubrix L, y los productos de Sigma Chemical Co: celulasa, alfa-amilasa, pectinasa, pectinesterasa, pectoliasa y dextranasa.

Proteasas útiles para esta invención, pero que no constituyen un límite, incluyen serín proteasas como tripsina y pepsina, ambas de Sigma Chemical Co.

5 El preparado de limpieza de esta invención se añade a sistemas acuosos en la cantidad adecuada para desprender tanto el biofilm en interfase como el sumergido y para modificar las propiedades reológicas de ambos tipos de biofilm. La dosis de cada una de las enzimas no es crítica para la invención y es ajustable a la naturaleza del sistema acuoso, tipo de microorganismo y condiciones  
10 ambientales. La concentración de carbohidrasa puede variar de 0.0001% a 10% y la de proteasa entre 0.001 y 100 U/mL.

La exposición del biofilm en interfase y sumergido al preparado de limpieza se lleva a cabo preferentemente en el rango de pH y temperaturas a los cuales las  
15 enzimas aplicadas son activas, generalmente pH entre 4 y 11, preferentemente entre 4,5 y 8 y temperatura en un intervalo de 10 a 60°C, preferentemente entre 25 y 50°C. El tiempo de exposición no es crítico para la invención, pudiendo variar desde 30 min a 24 h, preferentemente 1 h.

20 Finalmente este procedimiento que permite prevenir, desprender y facilitar la eliminación de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-líquido de sistemas acuosos, puede comprender la exposición del biofilm a carbohidrasas, o la exposición del biofilm a proteasas o la exposición del biofilm a carbohidrasas y proteasas. En este último caso, la exposición de biofilm  
25 se realiza en dos etapas secuenciales 1) exposición del biofilm a una preparación de limpieza que consiste esencialmente en carbohidrasas, 2) exposición del biofilm a una preparación de limpieza que consiste esencialmente en proteasas.

#### EXPLICACIÓN DE LOS DIBUJOS

30 Para facilitar la comprensión de las características de la invención y formando parte de esta memoria descriptiva, se adjuntan una serie de figuras que representan lo siguiente:

**Figura 1:** Representa imágenes digitales (2 aumentos) de biomasa de biofilm sobre vidrio (1.1) no expuesto a enzimas y (1.2) expuesto durante 60 min primero a Citrozym UltraL (1%) y luego a tripsina ( $10^4$ U/L), de la interfase (A) sólido-líquido-aire y (B) sólido-líquido

**Figura 2:** Muestra fotografías tomadas por microscopía electrónica de barrido a 2000 aumentos de células de biofilm (2.1) no expuesto a enzimas y (2.2) expuesto durante 60 min primero a Citrozym UltraL (1%) y luego a tripsina ( $10^4$ U/L)

**Figura 3:** Muestra la viscosidad aparente, dependiente de la velocidad de deformación de biofilm no expuesto a enzimas ( $\mu$ ) y expuesto a CitrozymUltraL (1%) ( $\lambda$ ) y posteriormente a CitrozymUltraL (1%) más tripsina ( $10^4$  U/L)( $\sigma$ ). En el eje de abscisas se representa el log de la viscosidad aparente en Pascales x segundo (Pa.s) y en el eje de ordenadas el log de la velocidad de deformación en  $s^{-1}$ .

## MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos que siguen, empleando como blanco biofilm estandarizado de *Pseudomonas*, por ser éste uno de los géneros cuya adhesión se ha estudiado con más frecuencia y que se encuentra más habitualmente en biofilms naturales formados en muy diversos hábitats.

Estos ejemplos son sólo ilustrativos y no establecen los límites en cuanto a condiciones, eficacia o aplicaciones de la invención, que se definen en las correspondientes reivindicaciones.

### Ejemplo 1: Obtención y cuantificación de biofilm en interfase y sumergido

Los biofilms se forman sobre superficies (cupones de 22 x 22 mm) de vidrio y acero inoxidable, dispuestas en posición vertical, parcialmente cubiertas con el medio de cultivo, de modo que parte del biofilm se formó en la interfase sólido-

líquido-aire y parte en la interfase sólido-líquido (zona sumergida), según se describe a continuación.

5        Antes de su uso, los cupones de vidrio se sumergieron en ácido nítrico (2 h) y se aclararon posteriormente con abundante agua bidestilada. Los cupones de acero inoxidable tipo 316, se dejaron sumergidos durante una noche en detergente neutro; a continuación se aclararon con agua destilada y se mantuvieron en etanol absoluto (2 h), siendo finalmente aclarados con agua bidestilada. Se empleó un  
10        soporte horizontal con 16 hendiduras radiales para el asentamiento de los cupones, quedando estos perfectamente sujetos. Los soportes, cargados con los cupones, se introdujeron en vasos de precipitados y el conjunto se esterilizó por calor seco, adicionándose posteriormente el cultivo bacteriano, de modo que cubriese tan solo la mitad inferior de los cupones.

15        Como microorganismo formador de biofilms se empleó *Pseudomonas fluorescens* cepa B52, cultivado en un medio mineral líquido, de pH 7, compuesto por: 10,70 g/L de ácido N,N-bis-(2-hidroxietil)-2-aminoetano sulfónico (BES); 11,00 g/L de piruvato sódico; 0,86 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,65 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 0,20 g/L de  $\text{MgSO}_4$  y 0,11 g/L de  $\text{CaCl}_2$ . Se requirieron tan solo 20 h de cultivo para la  
20        formación de un biofilm visible.

25        Para cuantificar la biomasa adherida a los cupones de vidrio y acero inoxidable, se realizó un análisis de imágenes por densitometría. Tras la incubación se retiraron los cupones, y las células débilmente adheridas fueron eliminadas sumergiendo verticalmente los cupones en solución salina. Manteniendo los cupones en posición vertical, los biofilms se secaron a temperatura ambiente, y a continuación se fijaron por inmersión en una solución de cloruro de cetilpiridinio 10 mM, 2 min y posterior secado a temperatura ambiente. La tinción del biofilm se realizó durante 1,5 min, con una solución 1  
30        g/L de azul de Coomassie, 250 mL/L de metanol y 100 mL/L de ácido acético. Para eliminar el exceso de tinte, los cupones se lavaron con abundante agua destilada, dejándolos secar finalmente a temperatura ambiente. Los biofilms



teñidos se analizaron en un densitómetro (BioRad GS-690) con detector de radiación visible, acoplado a un ordenador con un programa de análisis de imágenes (Molecular Analyst, BioRad). La cuantificación se basó en las medidas de densidad óptica (D.O.) de miles de puntos de cada imagen, calculándose a continuación, la D.O. media. La calibración de la cantidad de biomasa por medida de la densidad óptica se llevó a cabo con mucina porcina (Sigma Chemical Co), con cuyas soluciones se realizaron frotis sobre los cupones, que se fijaron y tiñeron siguiendo el procedimiento anterior.

El biofilm obtenido según se ha descrito, presenta mayor cantidad de biomasa acumulada en la interfase sólido-líquido-aire que en la interfase sólido-líquido. Concretamente, la biomasa del biofilm en interfase es 30% y 50% más abundante por  $\text{cm}^2$  que la del sumergido, en cupones de acero inoxidable y cupones de vidrio, respectivamente.

**Ejemplo 2:** Desprendimiento de biomasa de biofilm por exposición a carbohidrasas o proteasas

Los cupones de vidrio y acero en los que se había desarrollado biofilm, tal como se describe en el Ejemplo 1, se sumergieron en tampón fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ ) 0,067M de pH 7, durante 1 min en condiciones estáticas, para eliminar las células débilmente adheridas. A continuación cada cupón se sumergió durante 60 min, sin agitación, en el tampón (controles) o en la solución enzimática correspondiente, de modo que los cupones quedaban en posición vertical y totalmente cubiertos por la preparación. Tras la incubación, cada cupón se sometió a un lavado con el mismo tampón, para eliminar los restos de biofilm desprendido y de enzimas. La cantidad de biomasa desprendida se estimó por diferencia, mediante la técnica de análisis de imágenes por densitometría descrita en el Ejemplo 1.

Se ensayaron un total de 16 carbohidrasas puras o combinadas y 2 proteasas, a diferentes concentraciones. En la Tabla 1 se muestra el grado de

desprendimiento de biomasa obtenido con algunas de las enzimas. El porcentaje de biomasa eliminada alcanzó el 24-29% en biofilms expuestos a carbohidrasas puras, el 57-58% en los expuestos a carbohidrasas combinadas y el 35-39% en los expuestos a tripsina.

5

**Tabla 1.**

Nombre comercial de la enzima (concentración)	Porcentaje de biomasa desprendida	
	Biofilm en vidrio	Biofilm en acero
Citrozym Cloudy L (10%)	23	11
Citrozym Ultra L (10%)	44	58
Citrozym Ceo (10%)	45	20
Pectinex Ultra SP-L (10%)	34	31
Pectinex Smash (10%)	57	31
Bio-Cip Membrane (10%)	50	26
Cellubrix L (10%)	52	7

Celulasa (45 U/ml)	24	-
Pectinasa (5.94 U/ml)	-	29
Pectinesterasa (10 U/ml)	-	21
Pectoliasa (0.32 U/ml)	18	22
Dextranasa (12.9U/ml)	23	-
Tripsina ( $10^5$ U/L)	39	35

**Ejemplo 3:** Desprendimiento de biomasa de biofilm por exposición secuencial a carbohidrasas y proteasas

5 Los biofilms desarrollados sobre cupones de vidrio y acero, como se describe en el Ejemplo 1, se expusieron, según lo descrito en el Ejemplo 2, a carbohidrasas y proteasas en las dos etapas secuenciales posibles: 1) exposición del biofilm a carbohidrasas, seguida de exposición del biofilm a proteasas (en esta invención denominada secuencia C+P) y 2) exposición del biofilm a proteasas, seguida de  
10 exposición del biofilm a carbohidrasas (en esta invención denominada secuencia P+C). La exposición a cada una de las enzimas fue de 60 min, terminados con un lavado con el tampón fosfato antes descrito, para eliminar los restos de enzima y de biofilm desprendido. Como carbohidrasas se seleccionaron las que habían producido mayor desprendimiento (Tabla 1), a concentración de 10% y como  
15 proteasa, tripsina a concentración  $10^4$  U/L. Los resultados (Tabla 2), muestran que el empleo de ambos tipos de enzima de forma sucesiva produce mucho mayor desprendimiento que el obtenido con cada una de las enzimas aisladas, alcanzándose con la secuencia de tratamiento C+P, 84% de desprendimiento de biomasa de biofilm sobre acero y 75% de la de biofilm sobre vidrio.

**Tabla 2.**

Nombre comercial de las carbohidrasas	Porcentaje de biomasa desprendida según la secuencia de aplicación de las enzimas		
	P+C Vidrio	C+P Vidrio	C+P Acero
Citrozym Cloudy L	-	-	71
Citrozym Ultra L	55	75	84
Citrozym Ceo	58	34	-
Pectinex Ultra SP-L	42	15	-
Pectinex Smash	29	68	68
Biocip Membrane	40	62	70
Cellubrix L	51	47	-

En la figura 1 se muestran imágenes digitales del biofilm sobre vidrio no expuesto a enzimas (1.1), y expuesto a Citrozym UltraL y tripsina (1.2), en las que se distingue la interfase sólido-líquido-aire (A) y la sólido-líquido (B).

**Ejemplo 4:** Reducción del número de células adheridas y efecto en su viabilidad por exposición secuencial de biofilm a carbohidrasas y proteasas

Tras observar que la exposición del biofilm a carbohidrasas o proteasas, produce una considerable reducción en la biomasa adherida (mostrada en los Ejemplos 2 y 3), se estudió si esta se debe tan solo al desprendimiento de la matriz

del biofilm o por el contrario también provoca la disminución del número de células adheridas.

Biofilms desarrollados sobre cupones de vidrio, como se muestra en el Ejemplo 1, fueron expuestos a carbohidrasas y proteasas en las dos secuencias posibles (C+P y P+C), como se indica en el Ejemplo 2. A continuación, con el fin de determinar la proporción de células que permanecían adheridas, así como su viabilidad después del tratamiento enzimático, los biofilms fueron tratados para su observación por microscopía confocal, como se indica a continuación. Los cupones se cubrieron con una solución del fluorocromo indicador de células totales (SYTO 13 al 0,01%); tras 5 min, se lavaron con el tampón fosfato y a continuación, se cubrieron con el fluorocromo indicador de células muertas (yoduro de propidio al 0,005%), durante 10 min; finalmente, los cupones se aclararon suficientemente con el mismo tampón. En cada cupón se midió la fluorescencia en un total de 16 campos de observación, la mitad correspondientes al biofilm en interfase y la otra mitad al biofilm sumergido.

Para relacionar los datos de intensidad de fluorescencia con el número de células, se tomaron diversas diluciones de células en suspensión de un cultivo con  $10^7$  unidades formadoras de colonias (ufc)/ml de *Pseudomonas*, tiñéndose como se describe anteriormente. Seguidamente se prepararon con ellas frotis sobre cupones, en los que se determinó la intensidad de fluorescencia. La correspondencia entre el número de células y la intensidad de fluorescencia fue lineal.

La población presente en el biofilm antes de la exposición a enzimas, fue de aproximadamente  $5,9 \times 10^6$  ufc/cm<sup>2</sup> tanto en la interfase como en el biofilm sumergido. El porcentaje de células no viables de biofilm en interfase alcanzó el 7-8% (aproximadamente  $4 \times 10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>), mientras que en biofilm sumergido no superó el 1% (alrededor de  $6 \times 10^4$  ufc/cm<sup>2</sup>).

En la Tabla 3 se muestra el porcentaje de células eliminadas por las diversas preparaciones enzimáticas, distinguiendo el efecto sobre biofilm en interfase y biofilm sumergido. Todas las enzimas provocan desprendimiento celular en ambas zonas del biofilm. La exposición secuencial a carbohidrasa y tripsina fue más efectiva que la realizada con carbohidrasas solas. El empleo de la secuencia C+P provocó un grado de desprendimiento celular de 75-100%. El porcentaje de células no viables en la biomasa que permanece adherida tras los diversos tratamientos enzimáticos, no supera el 15% en la interfase y el 10% en el biofilm sumergido. Ninguno de los tratamientos afecta a la viabilidad de las células en los biofilms residuales.

**Tabla 3.**

Tratamiento enzimático aplicado	Porcentaje de células desprendidas	
	Biofilm en la Interfase	Biofilm Sumergido
Citrozym Ultra L	47	76
Citrozym Ultra L+Tripsina (C+P)	60	86
Tripsina+Citrozym Ultra L (P+C)	64	83
Pectinex Smash	23	63
Pectinex Smash +Tripsina (C+P)	87	82
Tripsina+ Pectinex Smash (P+C)	86	91
Bio-Cip Membrane	27	32
Bio-Cip Membrane+Tripsina (C+P)	100	100
Tripsina+ Bio-Cip Membrane (P+C)	84	87

Cellubrix	32	2
Cellubrix+Tripsina (C+P)	93	75
Tripsina+Cellubrix (P+C)	86	81

Otro método empleado para estudiar cualitativamente la biomasa residual presente en los cupones, tras la exposición del biofilm a las enzimas, fue la microscopía electrónica de barrido. Un cupón en el que se había desarrollado biofilm según el Ejemplo 1, se expuso secuencialmente a Citrozym UltraL y tripsina (C+P), tal como se muestra en el ejemplo 3. Este cupón junto con otro con biofilm no expuesto a enzimas, fueron recortados con un diamante, hasta un tamaño aproximado de 1 cm<sup>2</sup>, fijándose con una solución de glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 5 h a 4°C. Posteriormente, se lavaron por inmersión en tampón fosfato de pH 7 durante 1 h., renovando el tampón cada 15 min. Las muestras se deshidrataron por inmersión durante 15 min en una serie de disoluciones de acetona de concentración creciente (30, 40, 50, 70, 80, 90, 95 y 100%), y a continuación se trataron con CO<sub>2</sub> supercrítico en un equipo Balzen y se metalizaron con oro en un equipo de la misma marca. Las preparaciones así tratadas se examinaron en un microscopio electrónico de barrido Jeol, mod. JSM.6400 tomándose fotografías a 2000 aumentos que permitieron visualizar los cambios provocados por la exposición secuencial a carbohidrasas y proteasas. En la Figura 2 se muestran las fotografías del biofilm antes de su exposición a enzimas y tras su exposición secuencial a Citrozym UltraL y tripsina, con lo que se observa una dramática disminución en el número de células adheridas.

#### **Ejemplo 5:** Modificación de las propiedades reológicas del biofilm por exposición secuencial a carbohidrasas y proteasas

Para determinar los cambios provocados por la exposición a enzimas en las propiedades reológicas del biofilm, fue necesario en primer lugar la obtención de suficiente biomasa adherida, empleando como substrato placas grandes inmersas

en cubetas de cromatografía, como se describe a continuación. Las placas de vidrio de 20 x 20 x 0,5 cm, antes de ser utilizadas, se limpiaron tal y como se ha descrito en el Ejemplo 1 para los cupones de vidrio. En una cubeta de las empleadas en cromatografía de capa fina, se introdujeron 5 placas en posición vertical, sujetas por las hendiduras laterales presentes en la cubeta. El conjunto se esterilizó por calor seco. Seguidamente, y en condiciones estériles, se incorporó el cultivo de *Pseudomonas* en el medio mineral descrito en el Ejemplo 1. Transcurridas 24 h de cultivo, se retiraron las placas de la cubeta. La biomasa débilmente adherida se eliminó por inmersión vertical de las placas en una solución salina. Los biofilms de las 5 placas se recogieron manualmente por rascado con una espátula de plástico y se juntaron en un tubo Eppendorf. El exceso de agua incluido se eliminó por centrifugación a 114.926 g durante 5 min.

La caracterización reológica de la biomasa así obtenida, se determinó en un reómetro Bohlin, equipado con un cabezal de cilindros concéntricos. Dos alícuotas de 2 mL de biofilm, una de ellas con Citrozym<sup>TM</sup>UltraL incorporado al 1%, se incubaron separadamente durante 60 min, a 40°C y a presión constante de 0,1401 Pascales, en la propia cubeta del reómetro. Durante este tiempo, se registraron los cambios de viscosidad correspondientes. A continuación, cada una de las muestras se sometió a una serie de presiones crecientes, desde 0,1404 Pa, incrementando la presión aplicada un 25% cada 80 seg, lo que permitió la caracterización del comportamiento reológico de la muestra. La muestra que ya había sido incubada con la carbohidrasa y sometida a presiones altas, se incubó con tripsina a concentración de 10<sup>4</sup>U/L, en las condiciones previamente señaladas, antes de ser sometida a la misma serie de presiones indicadas, para medir su viscosidad aparente.

En la Figura 3 se observa el comportamiento reológico de cada una de las muestras. El biofilm no expuesto a enzimas, con viscosidad inicial del orden de 1 Pa s, presentó un comportamiento pseudoplástico, y la viscosidad disminuyó progresiva e indefinidamente al incrementarse la velocidad de deformación. Durante la incubación del biofilm con Citrozym<sup>TM</sup>UltraL, a presión constante de



0,1404 Pascales, se observó un comportamiento marcadamente reopexo y la viscosidad aumentó hasta más de 500 Pascales x seg. La aplicación de presiones crecientes provocó sin embargo una rápida e intensa disminución de la viscosidad en un rango de velocidades de deformación muy bajas. Cuando la velocidad de deformación alcanzó aproximadamente  $48 \text{ s}^{-1}$  (1,6 en la escala logarítmica de la Figura 3), provocada por la aplicación de presiones de aproximadamente 0,7 Pa, se produjo una transición de comportamiento pseudoplástico a Newtoniano, alcanzándose una viscosidad mínima y constante de 0,011 Pa s (-1,9 en la escala logarítmica de la Figura 3). Cuando este biofilm fue expuesto posteriormente a tripsina mostró comportamiento pseudoplástico solo a presiones muy bajas, que se convirtió en Newtoniano a velocidades de deformación semejantes a las ya mencionadas para el biofilm tratado con carbohidras.

En conclusión, a pesar de que la viscosidad de la muestra incubada con carbohidrasa es mucho mayor que la del biofilm control, la aplicación de muy ligeras presiones consigue convertir el biofilm tratado en un fluido Newtoniano de viscosidad comparable a la del agua. La acción de las enzimas facilita en gran medida el arrastre del material adherido mediante métodos mecánicos y disminuye también su capacidad de retención de las células.

## REIVINDICACIONES

- 1- Procedimiento enzimático para prevenir, desprender y facilitar la eliminación  
5 de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-  
líquido de sistemas acuosos, caracterizado por la exposición (por inmersión, baño,  
aspersión, etc) del biofilm a un preparado de limpieza que incluye al menos una  
enzima perteneciente al grupo de las carbohidrasas o proteasas, en una cantidad  
suficiente para que la matriz exopolimérica se degrade y permita el  
10 desprendimiento total o parcial del biofilm y se modifiquen sus propiedades  
reológicas, para facilitar la posterior eliminación del biofilm mediante otros  
procedimientos de limpieza y desinfección.
- 2- Procedimiento enzimático para prevenir, desprender y facilitar la eliminación  
15 de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-  
líquido de sistemas acuosos, según reivindicación anterior, caracterizado por la  
utilización de una carbohidrasa perteneciente al grupo de celulasas, hemicelulasas,  
pectinasas, amilasas o mezclas de las anteriores.
- 3- Procedimiento enzimático para prevenir, desprender y facilitar la eliminación  
20 de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-  
líquido de sistemas acuosos, según reivindicación 2, caracterizado por la  
utilización de los siguientes productos de Novo Nordisk AS: Citrozym Cloudy L,  
Citrozym LS, Citrozym Ultra L, Citrozym Ceo, Pectinex Ultra SP-L, Pectinex  
25 Smash, Bio-Cip Membrane, Cellubrix L.
- 4- Procedimiento enzimático para prevenir, desprender y facilitar la eliminación  
de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-  
líquido de sistemas acuosos, según reivindicaciones 2 y 3, caracterizado porque la  
30 preparación de limpieza incluye carbohidrasas a una concentración comprendida  
entre 0,0001% y 100%, preferentemente entre 0,1 y 10%, y posee un pH entre 3 y

11, preferentemente entre 4,5 y 8, y una temperatura entre 10 y 60° C, preferentemente entre 25 y 50° C.

- 5 5- Procedimiento enzimático para prevenir, desprender y facilitar la eliminación de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-líquido de sistemas acuosos, según reivindicación 1, caracterizado por la utilización de una proteasa perteneciente al grupo de serín proteasas, metalo proteasas, cisteín proteasas, aspártico proteasas o mezclas de las anteriores.
- 10 6- Procedimiento enzimático para prevenir, desprender y facilitar la eliminación de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-líquido de sistemas acuosos, según reivindicación 5, caracterizado por la utilización de tripsina como proteasa perteneciente al grupo de las serín proteasas.
- 15 7- Procedimiento enzimático para prevenir, desprender y facilitar la eliminación de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-líquido de sistemas acuosos, según reivindicaciones 1, 5 y 6, caracterizado porque la preparación de limpieza incluye proteasas a una concentración comprendida entre 0,001 y 100 U/mL, preferentemente entre 1 y 10 U/mL, y posee un pH entre
- 20 3 y 11, preferentemente entre 6 y 8, y una temperatura entre 10 y 60° C, preferentemente entre 30 y 45° C.
- 25 8- Procedimiento enzimático para prevenir, desprender y facilitar la eliminación de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-líquido de sistemas acuosos, según reivindicaciones anteriores, caracterizado por comprender las siguientes etapas secuenciales 1) exposición (por inmersión, baño, aspersión, etc) del biofilm a una preparación de limpieza que consiste esencialmente en carbohidrasas, 2) exposición (por inmersión, baño, aspersión, etc) del biofilm a una preparación de limpieza que consiste esencialmente en
- 30 proteasas.

- 9- Procedimiento enzimático para prevenir, desprender y facilitar la eliminación de biofilm acumulado tanto en la interfase sólido-líquido-aire como en la sólido-líquido de sistemas acuosos, según reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las preparaciones enzimáticas de limpieza son compatibles con la
- 5 utilización independiente o combinada de uno o más agentes pertenecientes al grupo de biocidas, surfactantes, quelantes, dispersantes, encapsulantes de baja densidad, inhibidores de la corrosión, agentes poliméricos, fosfatos, polifosfatos, silicatos, tampones, carboxilatos, sulfonatos.

1/3

FIGURA 1

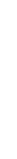
1.1



A

B

1.2

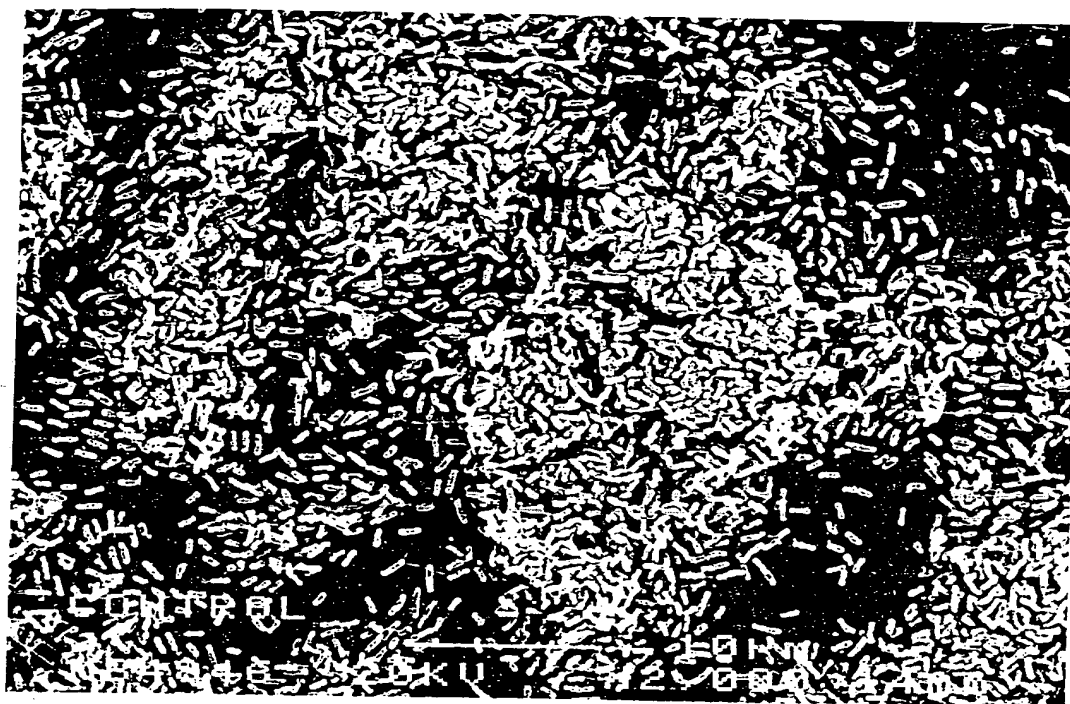


A

B

2/3

2.1



2.2

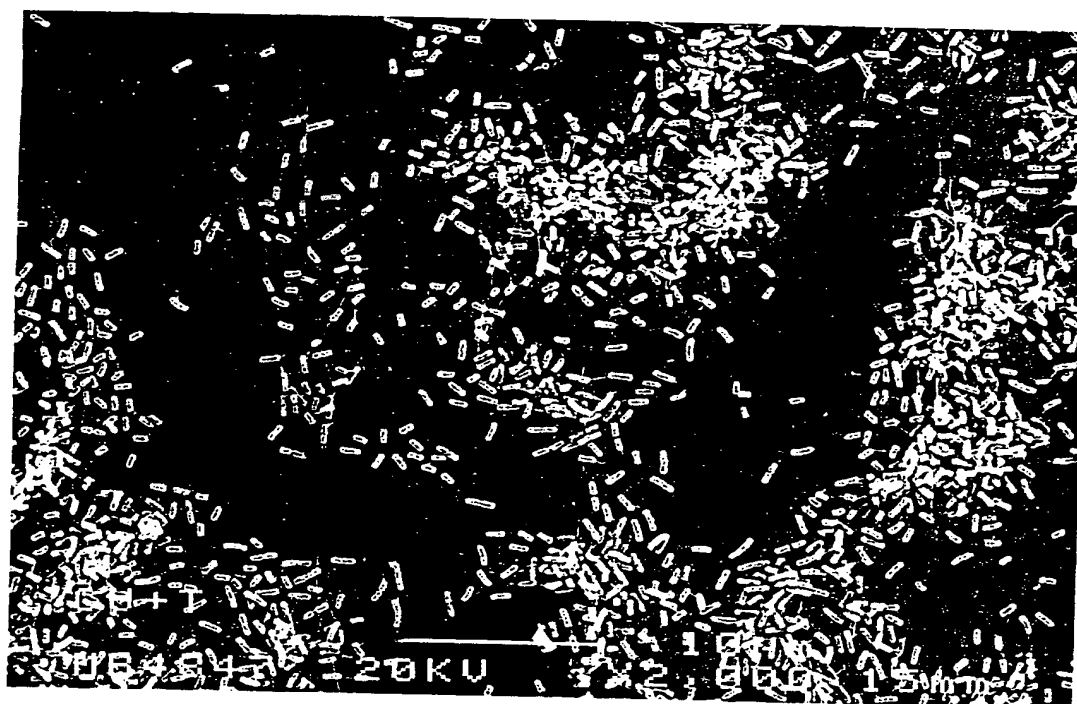
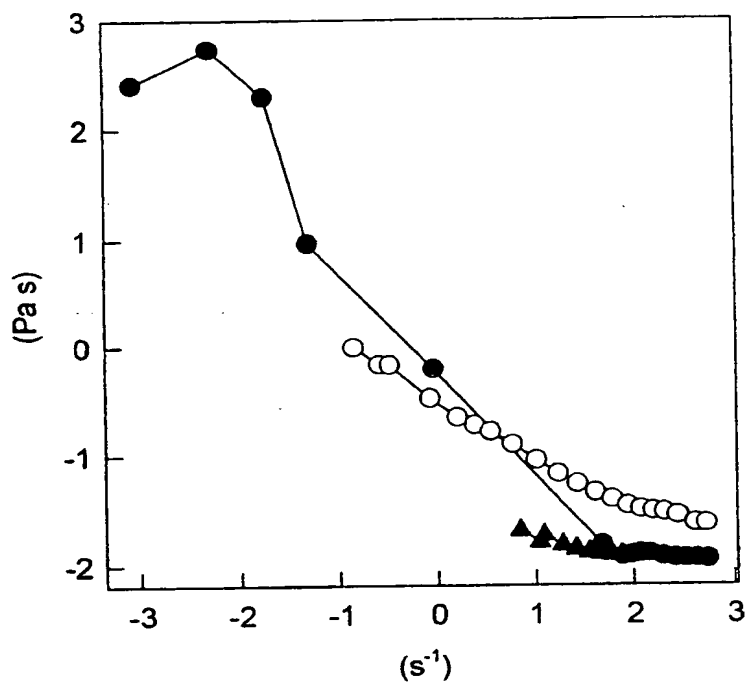


FIGURA 2

3/3

Figura 3:



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ ES 00/00360

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B08B 3/04 , 17/02, C11D 3/386

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 B08B C11D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0590746 A1 (W.R. GRACE & CO. -CONN. GRACE PLACE) 06 April 1994 (06.04.94) abstract and claims	1, 2, 5 - 7, 9
X	WO 98/2607 A1 (NOVO NORDISK A/S) 25 June 1998 (25.06.98) page 4, line 1 to page 7, line 25	1, 2, 5, 6
X	WO 92/13807 A1 (BUCKMAN LABORATORIES INTERNATIONAL, INC.) 20 August 1992 (20.08.92) abstract and claims	1, 2, 6, 9

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
26 December 2000 (26.12.00)

Date of mailing of the international search report  
18 February 2001 ( 18.01.01)

Name and mailing address of the ISA/

SPT0

Authorized officer

Telephone No.



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International Application No

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0590746 AB	06.04.1994	CA 2106609 A JP 6262165 A AT 162499T T DE 69316501D D ES 2111710T T DK 590746T T	29.03.1994 20.09.1994 15.02.1998 26.02.1998 16.03.1998 14.09.1998
WO 9826807 A	25.06.1998	AU 5310298 A EP 0946207 A US 6100080 A	15.07.1998 06.10.1999 08.08.2000
WO 9213807 A	20.08.1992	CA 2080373 A AU 1370292 A FI 924013 A,B EP 0525166 AB BR 9204122 A AU 648881 B US 5411666 A AT 126181T T DE 69203992D D DK 525166T T ES 2078738T T GR 3017935T T DE 69203992T T NO 303980B B	13.08.1992 07.09.1992 08.09.1992 03.02.1993 08.06.1993 05.05.1994 02.05.1995 15.08.1995 14.09.1995 25.09.1995 16.12.1995 29.02.1996 21.03.1996 05.10.1998

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°  
PCT/ ES 00/00360

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP<sup>7</sup> B08B 3/04, 17/02, C11D 3/386

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP<sup>7</sup> B08B C11D

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	EP 0590746 A1 (W.R. GRACE & CO.-CONN. GRACE PLACE) 06.04.1994, resumen y reivindicaciones	1,2,5-7,9
X	WO 98/26807 A1 (NOVO NORDISK A/S) 25.06.1998, pág. 4, línea 1 a pág. 7, línea 25	1,2,5,6
X	WO 92/13807 A1 (BUCKMAN LABORATORIES INTERNATIONAL, INC.) 20.08.1992, resumen y reivindicaciones	1,2,6,9

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

\* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 26 Diciembre 2000 (26.12.2000)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

18 ENE 2001 18. 01. 01

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

Alfonso Maquedano

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.  
n° de fax +34 91 3495304

n° de teléfono + 34 91 3495474

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**  
 Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES 00/00360

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
EP 0590746 AB	06.04.1994	CA 2106609 A	29.03.1994
		JP 6262165 A	20.09.1994
		AT 162499T T	15.02.1998
		DE 69316501D D	26.02.1998
		ES 2111710T T	16.03.1998
		DK 590746T T	14.09.1998
WO 9826807 A	25.06.1998	AU 5310298 A	15.07.1998
		EP 0946207 A	06.10.1999
		US 6100080 A	08.08.2000
WO 9213807 A	20.08.1992	CA 2080373 A	13.08.1992
		AU 1370292 A	07.09.1992
		FI 924013 A,B	08.09.1992
		EP 0525166 AB	03.02.1993
		BR 9204122 A	08.06.1993
		AU 648881 B	05.05.1994
		US 5411666 A	02.05.1995
		AT 126181T T	15.08.1995
		DE 69203992D D	14.09.1995
		DK 525166T T	25.09.1995
		ES 2078738T T	16.12.1995
		GR 3017935T T	29.02.1996
		DE 69203992T T	21.03.1996
		NO 303980B B	05.10.1998

THIS PAGE BLANK (USPTO)